

論文審査の結果の要旨

氏名 福田 智行

本論文は、三章からなる。その内容については以下のとおりである。

DNA の切断は生物にとって危険な損傷である一方で、例えば減数分裂期組換えや抗体遺伝子の再編成のように、細胞は厳密な制御下で積極的に切断を誘導し修復することで遺伝情報の再構築を行う。また、時に DNA の切断は種々の可動性遺伝因子のコピー増幅に利用される。タンパク質のコーディング領域に介在配列として存在する「インテイン」は、翻訳後タンパク質レベルでのスプライシング反応によって切り出されるが、同時に染色体の二重鎖切断を利用した可動性遺伝因子としてゲノム中を動く、「ホーミング」と呼ばれる遺伝現象を引き起こすことが知られている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のある系統では、第四番染色体上にある *VMA1* 遺伝子座に可動性遺伝因子として働く *VMA1* インテインが挿入されている。このインテインを持つ系統と持たない系統が接合してできたヘテロ二倍体が、栄養枯渇に直面して減数分裂し胞子を形成する際に、インテインにコードされる部位特異的エンドヌクレアーゼ VDE (*VMA1*-derived endonuclease) はインテインを持たない染色体上の配列を認識し、DNA の二重鎖切断を引き起こす。この切断がインテインを持つ染色体を鋳型にして修復される結果、切断された箇所にインテインが挿入されることになる。「ホーミング」と呼ばれるこの現象により、*VMA1* インテインは酵母集団中に効率良くコピーを増幅してゆくことができる。*VMA1* インテインのホーミングに関するこれまでの研究は VDE の切断活性に関する生化学的解析や構造解析が主であった。しかし、ホーミングの全貌を明らかにするためには、出芽酵母内でおきる減数分裂期特異的な染色体切断とそれに続く DNA 修復というホーミング過程そのものを研究する必要がある、宿主である出芽酵母側の因子の解析も不可欠であると考えられる。そこで本研究では、ホーミングの各過程における宿主因子の関わりについて、主に遺伝子破壊株を用いた解析により明らかにすることを目的とした。

1. VDE による二重鎖切断を修復する機構の解析

まず、最初からインテインを持っているドナーの染色体とホーミングによりインテインを獲得した染色体とを区別できるように、制限酵素サイトの多型を導入した株を作成した。この株を同調した減数分裂に誘導し、サザン解析を行うことで、減数分裂誘導後 2-3 時間で VDE による二重鎖切断が誘導され、5 時間からホーミング産物が蓄積していく様子をモニターすることができた。この時期は減数分裂期組換えが起きている時期に相当する。減数分裂期組換えはほとんどの真核細胞に見られる現象で、*Spollp* によって染色体の二重鎖切断が引き起こされ、その切断が相同染色体を鋳型とした相同組換えに

より修復される反応である。ホーミングの時期とその特徴から、VDE による二重鎖切断は減数分裂期組換えと同様の経路によって修復されているのではないかと予想した。そこで、相同組換えの鍵となる RecA 様タンパク質である Rad51p とそれに相互作用する Rad54p 及び、減数分裂期のみで発現する RecA 様タンパク質である Dmclp とそれに相互作用する Tidlp をコードする遺伝子の破壊株をそれぞれ作成し、サザン解析によりホーミングを観察した。いずれの遺伝子破壊株においてもホーミングは著しく減少しており、VDE によって切断された DNA が修復されずに残っていた。特に、減数分裂期に発現して働く *DMC1*, *TID1* 遺伝子破壊株ではより顕著な欠損が見られた。また、ホーミングには減数分裂期組換えの特徴である Exo1p や Msh4p に依存した高頻度の交叉が伴っていた。以上の結果からホーミングは減数分裂期組換えと同時期に同様の経路で進行していることが明らかになった。

2. VDE による二重鎖切断の減数分裂特異性を産み出す機構の解析

VDE による二重鎖切断が減数分裂期組換えと同様の経路で修復されるのは、その切断が減数分裂期特異的に導入されることに起因すると考えられた。そこで、VDE による認識配列の二重鎖切断が減数分裂期特異的に起きる機構を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。VDE の発現量をウェスタン解析により調べたところ、VDE は減数分裂誘導の前後で変わらず発現していた。更に、VDE のもつエンドヌクレアーゼ活性が減数分裂誘導の前後で変化するかどうかを調べるために、VDE を免疫沈降し、認識配列を含む DNA とインキュベートしたところ、減数分裂誘導の前後で同程度の活性を示した。これらの解析から、VDE による二重鎖切断の減数分裂期特異性が VDE 自身の発現量の変化や、修飾等によるエンドヌクレアーゼ活性の変化によるものである可能性は否定された。次に、宿主である出芽酵母側の因子が関与している可能性を検討するために、減数分裂の進行の各過程を阻害し、それぞれの条件下におけるホーミングをサザン解析によりモニターした。まず、減数分裂の誘導に必要な *IME1*, *IME2* 遺伝子破壊株では VDE による切断及びホーミングは観察されなかった。また、減数分裂前 DNA 複製をヒドロキシ尿素の添加または、*CLB5*, *CLB6* 遺伝子の二重破壊により阻害すると、VDE による切断及びホーミングに著しく減少、遅延が見られた。一方、減数分裂前 DNA 複製以降のイベントである核分裂や胞子の形成を阻害したところ、VDE による切断、ホーミングに欠損は見られなかった。以上の結果から、VDE による染色体の二重鎖切断は減数分裂前 DNA 複製の後に活性化していると考えられる。*Spo11p* による染色体の切断にも減数分裂前 DNA 複製が必要であることが知られていることから、ホーミングは修復の過程だけでなく二重鎖切断の過程においても減数分裂期組換えと類似の制御を受けていることが示唆された。

以上の解析から、ホーミングの減数分裂期特異性には VDE に切断される染色体の側に要因がある可能性が挙げられた。そこで、VDE の認識配列付近のクロマチン構造を球菌ヌクレアーゼの感受性により解析したところ、認識配列付近のクロマチン構造は減数分裂誘導後に変化していることが明らかになった。インテインを挿入した染色体ではこのクロマチン構造の変化が見られず、VDE の認識配列を *VMA1* とは異なる遺伝子座に挿入した株では、挿入した認識配列周辺で減数分裂誘導後にクロマチン構造の変化が見られた。また、減数分裂の誘導に欠損を持つ *IME1* または *IME2* 遺伝子破壊株や一倍体細胞ではクロマチン構造の変化は見られず、減数分裂前 DNA 複製に欠損をもつ *CLB5*, *CLB6* 遺伝子

二重破壊株においても変化は見られなかった。したがって、VDE の認識配列近傍では減数分裂の進行に依存してクロマチン構造に変化が生じ、この変化が契機となって VDE による染色体の二重鎖切断及びホーミングが誘導される可能性が示された。

3. VDE を利用した出芽酵母の二重鎖切断修復機構の解明

VDE は時期特異的に、特定の箇所へ高頻度に二重鎖切断を導入することができる。また、上述のようにその切断は減数分裂期組換えと同様の経路で修復される。そこで、出芽酵母の二重鎖切断修復機構、特に減数分裂期組換え機構の解析に VDE をツールとして用いることができるのではないかと考えた。減数分裂期組換えには RecA 様タンパク質である Rad51p、Dmclp に加えて、多数の関与する因子が同定されており、これら因子の遺伝子破壊株は Spo11p による染色体の二重鎖切断の修復に欠損を示す。まず、これら因子の遺伝子破壊株では VDE による二重鎖切断の修復にも同様の欠損が見られることをサザン解析により確認した。次に、これら因子が関与する修復過程をより詳細に明らかにするために、クロマチン免疫沈降法を用いて VDE の切断した DNA と Rad51p、Dmclp との結合をモニターすることにした。Rad51p と Dmclp に Myc タグと Flag タグをそれぞれ結合した株を作成し、同調した減数分裂を誘導後取得したサンプルから、抗 Myc 及び抗 Flag 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。何れの抗体の免疫沈降物からも VDE の認識配列近傍の DNA が濃縮されており、Rad51p と Dmclp は共に VDE による切断箇所へ結合していることが示された。次に、ホーミングに欠損を示した遺伝子破壊株において両タンパク質の切断箇所への結合を解析した。その結果、RAD52、RAD55、RAD57 遺伝子破壊株では Rad51p の切断箇所への結合に欠損が見られ、SAE3 遺伝子破壊株では Dmclp の結合に欠損が見られた。更に、TID1 遺伝子破壊株では Dmclp が切断の起きていない箇所へも結合してしまう可能性を示す結果を得た。これらの解析から、Rad51p は Rad52p、Rad55p、Rad57p の働きにより、Dmclp は Sae3p の働きによりそれぞれ独立に二重鎖切断箇所へ運ばれて結合し、その後の修復反応を行うことが明らかになった。以上の解析により、減数分裂期における二重鎖切断修復機構の新たな知見が得られただけでなく、VDE やホーミングの解析ツールとしての有効性が示された。

本研究では、種々の遺伝子破壊株を用いてホーミングの過程をモニターすることで、VMA1 インテインのホーミングには VDE に加えて多数の宿主因子が二重鎖切断及び修復の過程に関与していることを明らかにした。また、VDE による二重鎖切断を利用することで、減数分裂期組換えには Rad51p と Dmclp をそれぞれ切断箇所へ運ぶ過程が存在し、複数の因子がこの過程に関与していることを明らかにすることができた。VMA1 インテインは、減数分裂期組換えという、細胞が厳密な制御下で DNA の二重鎖切断と修復を行う現象の諸システムを巧みに利用することで可動性の原動力とし、あたかも減数分裂期組換えの 1 つであるかのように進行する。その結果、宿主の生存に影響せず、且つ効率よくコピーを増幅することが可能になり、酵母集団中に伝播していったのではないだろうか。

なお、本論文は論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。